

(51)Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 7/06	Z N A Z	8318-4H		
A 6 1 K 37/02	A A B	8314-4C		
	A A K			
	A A M			
	A A P			

審査請求 未請求 請求項の数5(全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-289398

(22)出願日 平成4年(1992)10月2日

(71)出願人 000006877

山之内製薬株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

(71)出願人 592225102

乾 明夫

兵庫県神戸市西区桜が丘西町4-8-2

(72)発明者 古賀 浩伸

茨城県つくば市二の宮2-5-9 ルーミ  
ー第209

(72)発明者 越谷 和雄

茨城県つくば市春日2-35-2 ネットワー  
ル春日304

(74)代理人 弁理士 長井 省三 (外1名)

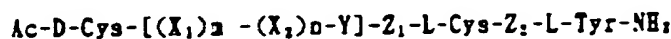
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ペプチド

(57)【要約】

【構成】一般式

【化1】



(式中の記号は以下の意味を示す。

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>: 同一または異なって Gly, Ala, Val, Leu または Ile

m, n: 同一または異なって0または1

Y: Gly, Ala, Val, Ser または Thr

Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>: 何れか一方は L-Arg. 他方は L-Arg, L-His, L-Leu, L-Val )

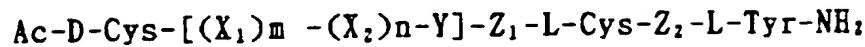
で示される新規ペプチドまたはその塩。

【効果】 中枢神経系または末梢神経系に作用し、それらに関与する種々の疾患の予防及び治療に有用である。

【特許請求の範囲】

\*【化1】

【請求項1】 一般式



(式中の記号は以下の意味を示す。

$X_1, X_2$  : 同一または異なって Gly, Ala, Val, Leu  
または Ile

$m, n$  : 同一または異なって 0 または 1

$Y$  : Gly, Ala, Val, Ser または Thr

$Z_1, Z_2$  : 何れか一方は L-Arg, 他方は L-Arg, L-Hrg, L-Lys, L-Nle, L-Leu または L-Val)

で示される新規ペプチドまたはその塩。

※【請求項2】  $-(X_1)_m-(X_2)_n-Y-$  が、 $-[Leu-Ile-$

Thr)- または  $-[Gly]-$  である請求項1記載の新規ペ

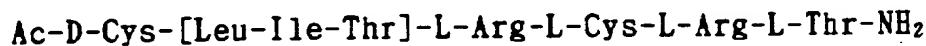
10 チドまたはその塩。

【請求項3】  $Z_1, Z_2$  が共に L-Arg である請求項1

記載の新規ペプチドまたはその塩。

【請求項4】

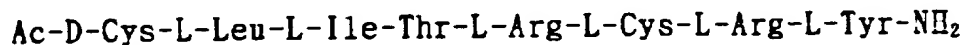
【化2】



で示される新規ペプチドまたはその塩。

★【化3】

【請求項5】



で示される新規ペプチドまたはその塩

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ニューロペプチドY受容体に親和性を有する新規ペプチドに関する。また、該ペプチドを有効成分として含有する医薬に関する。

【0002】

【従来の技術】ニューロペプチドY(NPY)は腫瘍ペプチド類に属するアミノ酸36残基からなるペプチドで、ヒトおよび動物の中枢および末梢組織に広く分布する。中枢神経系においてNPYは、摂食促進作用、抗痙攣作用、学習促進作用、抗不安作用、抗ストレス作用等を有している。また、うつ病、アルツハイマー病およびパーキンソン氏病において脳脊髄中のNPY量が低下することが、頭部外傷に伴い脳内のNPY量が増加することが知られている。一方、末梢組織において、NPYは血管収縮性ペプチドともいわれ、血管等平滑筋の収縮調節、心臓収縮性の調節、レニン等の血圧調節ホルモンの分泌調節等を司っている。

【0003】NPY受容体親和性物質(NPY受容体アゴニストおよびアンタゴニスト)は、上記NPYの生理作用に関連する種々の疾患、すなわち過食症および拒食症、不安定神経症、老人性痴呆症、パーキンソン氏病、

☆うつ病、高血圧症および低血圧症等に代表される疾患の治療薬として有用であると考えられる。NPYはそのC末端側が生理活性(親和性)の発現に必須であることが知られている。活性を有する最小の断片はNPY<sub>29-36</sub>であることが報告されているが、その活性は非常に弱いものである。

【0004】生理活性のあるNPY断片としてはこれまで報告された最小のものは、Tatemoto らによるアミノ酸10残基からなるNPY<sub>27-36</sub>断片である[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1174(1992)]。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、生体内での安定性、脳内移行性を考慮する時、公知のアミノ酸断片は、医薬品として実用上十分なものとは言えず、受容体に対する高い親和性と安定性を有するNPY誘導体の開発が期待されている。従って、本発明の目的は短鎖しかも公知のNPY断片に比べて格段に優れた受容体親和性を有するペプチドを提供することである。さらに、NPYに関連する疾患の治療に有用な生理活性ペプチドを提供することを目的としている。

【0006】

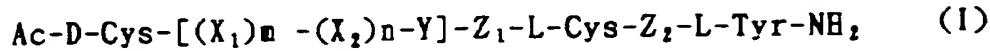
【課題を解決するための手段】本発明者らは、NPY誘導体に関し鋭意検討を行った結果、従来のNPY断片と

30

40

50

は異なりD型システインを含有する環状新規ペプチドを \* 【0007】  
見出し本発明を完成した。すなわち本発明は、一般式 \* 【化4】



【0008】(式中の記号は以下の意味を示す。

$X_1, X_2$  : 同一または異なって Gly, Ala, Val, Leu  
または Ile

$m, n$  : 同一または異なって 0 または 1

$Y$  : Gly, Ala, Val, Ser または Thr

$Z_1, Z_2$  : いずれか一方は L-Arg, 他方は L-Arg,  
L-Hrg, L-Lys, L-Nle, L-Leu または L-Val)

で示される新規ペプチドまたはその塩である。

【0009】以下、本発明化合物につき詳細に説明する。本発明化合物内のアミノ酸残基の記号は、下記の意味を示す。

Cys	システイン
Tyr	チロシン
Gly	グリシン
Ala	アラニン
Val	バリン
Leu	ロイシン
Ile	イソロイシン
Ser	セリン
Thr	スレオニン
Arg	アルギニン
Hrg	ホモアルギニン

※ Lys

リジン

Nle

ノルロイシン

10 【0010】また、これらのアミノ酸残基は、指定のない限りD型アミノ酸残基もしくはL型アミノ酸残基といずれであってもよい。本発明化合物(I)中の  $-(X_1)_m-(X_2)_n-Y$  における  $X_1, X_2$  では Gly, Ala, Val, Leu または Ile であり、また  $Y$  では Gly, Ala, Val, Ser または Thr である。 $m$  および  $n$  は、 $X_1$  および  $X_2$  のいずれか一方または両方が存在しない場合があることを意味している。好適には  $X_1$  および  $X_2$  が共に存在し、 $X_1$  が Leu,  $X_2$  が Ile である。又、その場合  $Y$  は Thr が好ましい。

20 【0011】 $X_1, X_2$  および  $Y$  のアミノ酸残基は、L型もしくはD型のいずれでもよい。好ましくはL型である。 $Z_1, Z_2$  におけるアミノ酸残基は、何れか一方は L-Arg であり、他方は L-Arg, L-Hrg, L-Lys, L-Nle, L-Leu, L-Val から選ばれる。好適には、 $Z_1, Z_2$  は共に L-Arg である。一般式(I)に包含される、本発明化合物の代表的なものを挙げると次のとおりである。

【0012】

【化5】

※

6

\* 50

基にジスルフィド結合を形成させる。

【0015】①ペプチド化合物の製造法：本発明のペプチド化合物の製造は、ペプチド合成法の一つである各種保護基、カップリング試薬などを駆使して行うカップリング法、C末端末端活性化法、N端活性化法などの液相法を用いて合成することは勿論可能であるが、簡便に生産および精製ができる固相法 [Merrifield; J. Am. Chem. Soc., 85, 2185 (1963) によって初めて紹介され、その後改良が加えられている方法] を適用して合成するのが有利である。固相法によってペプチドを合成するにあたっては、優れたペプチド自動合成機；例えばアブライド・バイオシステムズ社のペプチド合成機、430Aが市販されており、この装置の標準的運転プログラムに従って行えばよい。なお、本発明化合物の製造法としては、現在市販の装置の適用のみに限定されるべきものでないことはいうまでもない。これらのペプチド合成機による合成はラセミ化を伴うことが少なく、原料アミノ酸の立体配置が維持された目的化合物を得ることができる。

【0016】合成されたペプチドはさらに精製度を高めるため分取用逆相高速液体クロマトグラフィーなどによって、精製するのが有利である。なお、ペプチド自動合成機による合成においては、アミノ保護基の除去を一般にトリフルオロ酢酸で行うため、最終生成物は、トリフルオロ酢酸塩として単離されるが、イオン交換クロマトグラフィーなどにより種々の塩として単離することができる。合成ペプチドの純度、安定性を維持するためには、凍結乾燥するのが好適である。なお、自動化ペプチド合成機によるペプチド合成手順はおよそ次の手順が行われるものである。

- 【0017】1) 固相樹脂に目的とするポリペプチドのC末端 $\alpha$ -アミノ保護アミノ酸Aを縮合させる。
- 2)  $\alpha$ -アミノ保護アミノ酸Aの保護基の除去—洗浄—中和—洗浄の操作を行う。
- 3) 目的とするポリペプチドを構成する $\alpha$ -アミノ保護アミノ酸を順次縮合させる。
- 4)  $\alpha$ -アミノ保護アミノ酸の保護基の除去—洗浄—中和—洗浄の操作を行う。
- 5) 目的とするポリペプチドを合成した後、N末端のアミノ基をアセチル化する。
- 6) 固相樹脂から目的とするペプチドを切り離し、アミノ酸残基の全側鎖に結合している保護基の除去を行う。
- 7) 6) で得られた遊離ペプチド内の2個のチオールを用いて酸化環状反応を行う。

また、ペプチド化合物を製造する別の方法として、このペプチドをコードするDNAを用いて遺伝子工学的手法により行うことも可能である。

【0018】②ジスルフィド結合の形成：次に、①で得られたペプチド化合物における2つのCysのSH基に分子内ジスルフィド結合を形成させるには酸化処理すればよい。例えば、固相法により合成されたペプチドを上

記の方法により固相樹脂から切断及びアミノ酸残基の全側鎖の結合している保護基の除去した後、遊離のチオール基を酢酸アンモニウム緩衝液中過酸化水素酸を加え酸化させることにより行うことができる。

【0019】単離・精製は、各種クロマトグラフィー、塩析法、結晶化法、再過法、濃縮法または遠心分離法等を用いて行われる。本発明化合物の構造確認法は、HPLC、アミノ酸分析、元素分析、マイクロエンシングまたはペプチドマッピング法が挙げられる。

10 【0020】

【発明の効果】本発明化合物はNPY誘導体としてNPYの生理機能に関連する種々の疾患、すなわち過食神経症、拒食神経症、肥満、てんかん、不安神経症、老人性痴呆症、うつ病、パーキンソン病、頭部外傷に伴う脳組織変性、ストレスに起因する種々の身体症状、高血圧症、低血圧症、心不全、狭心症、喘息、下痢、ホルモン異常等の治療薬として有用である。本発明化合物はまた、糖尿病患者における食事療法の補助薬として、また、術中、術後、ショック時あるいは褐色細胞腫の際の血圧管理に用いる薬剤として有用である。本発明化合物の作用は、以下のような試験方法によって確認された。

20 【0021】

ヒト神経芽細胞腫由来のSK-N-MC細胞またはブタ海馬から調製した膜原本を本発明の化合物および $10^{-10}$  Mの $[^{125}\text{I}]$ -ホルトンハンター-NPYまたは $[^{125}\text{I}]$ -ペプチドYY (PYY)、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、1 mg/ml パシトラシン、及び5 mM ウシ血清アルブミンを含む25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中で25°C、90分または180分間インキュベートした後、10,000×g、3分間の遠心により膜結合放射能を分離した。非特異的結合は1  $\mu$ MのNPYまたはPYY存在下で測定した。

30 【0022】

この薬理試験において本発明化合物は、NPY受容体に対する高い親和性を示した。本発明化合物またはその塩の1種または2種以上を有効成分として含有する製剤は、通常用いられる調剤用の担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて、注射剤、吸入剤、坐剤、経皮剤、軟膏、経皮用貼付剤、経粘膜貼付剤 (例えば口腔内貼付剤)、経粘膜用液剤 (例えば経鼻用液剤) などに調製され、非経口的に投与するのが好ましい。

40 【0023】

製剤用の担体や賦形剤としては、固体又は液状の非毒性医薬用物質が挙げられる。これらの例としては、例えば乳糖、ステアリン酸マグネシウム、スターチ、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油、ゴマ油、カカオバター、エチレングリコール等やその他常用の物が例示される。本発明化合物の臨床投与量は、適用される患者の疾患、体重、年齢や性別、投与ルート等を考慮して適宜設定されるが、通常成人で一日当り1〜500 mgでありこれを1回あるいは2〜4回に分けて投与する。

50

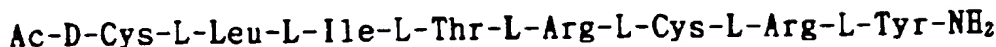
【0024】

【製造法】次に実施例により本発明を更に詳細に説明するが、これらの実施例に限定されない。

\* 実施例1

【0025】

【化6】



【0026】1) t-Boc (tert-ブトキシカルボニル基) 法によるペプチドの固相合成

装置: Applied Biosystems 社製 ペプチド自動合成装置430A

合成手順は合成機に組み込まれているソフトウェアに従って行った。

アミノ酸誘導体および樹脂 (ペプチド研究所製)

MBHA樹脂 (p-メチルベンツヒドリルアミン樹脂)

Boc-Tyr (BrZ), Boc-Arg (Tos), Boc-Cys (4-MeBzl), Boc-Thr

(Bzl), Boc-Ile, Boc-Leu, Boc-D-Cys (4-MeBzl)

反応補助試薬

ジクロロメタン (DCM), ジメチルホルムアミド (DMF), ジイソプロピルエチルアミン (DIEA), トリフルオロ酢酸, ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC), 無水酢酸

【0027】2) 合成方法

合成はC末端より始めてN末端に向けて行う。まず activation 槽中で最初の Boc-Tyr (BrZ) をDCCにより充分活性化しておき反応槽にあるMBHA樹脂と反応させる。反応終了後、次のアミノ酸を縮合させるためTFA処理を行って樹脂上にあるBoc基の除去をし、DIEAで中和後、同様に次のアミノ酸誘導体 (Boc-Arg(Tos)) をDCCで縮合させる。この操作をプログラムに従って自動的にN末端アミノ酸まで繰り返す。最後にTFA処理でBoc基を除去しDIEAで洗浄後、無水酢酸処理によりN末端アミノ基をアセチル化した。

【0028】3) 固相樹脂からのペプチドの切り出し  
合成保護ペプチド樹脂にp-クレゾールを加えHF処理装置にセットした後、-2~-5℃、60分間処理を行い、固相樹脂からペプチドの切り出しと同時にアミノ酸の全側鎖保護基の除去操作を行った。反応後HFを減圧下に留去した後50%酢酸水溶液にて粗ペプチドを抽出し、樹脂をろ別したのち凍結乾燥により粉末を得た。分析RP-HPLCは明らかなメインピークを与えた。

4) 酸化環化化反応

上記で得られたチオール遊離の粗ペプチドを酢酸アンモ※

※ニウム緩衝液に溶解し (溶解しにくい場合には尿素を加える), 過酸化水素を加え、pH8に調整し、反応をRP-HPLCで追跡。反応が終了していることの確認後、アスコルビン酸を加えて反応を止め、pHを酸性にして、直接RP-HPLCの分取精製にかけ、目的とするピークの単離を行った。

【0029】RP-HPLCによる精製

カラム ODS系 逆相カラム

分析 4.6×150mm, s-5 120A ODS

分取 30×250mm, s-5 120A ODS

溶離液 A: 0.1% TFA水

B: 0.1% TFAアセトニトリル

分析 25分

分取 60分

検出 220nm

【0030】理化学的性状

外観: 白色粉末

アミノ酸分析値

水解条件: 6N HCl, 110℃, 22h

Thr(1)0.90 1/2Cystine(2)1.95 Ile(1)0.96 Leu(1)1.00

30 Tyr(1)0.94 Arg(2)2.00 Nhs(1)1.15

純度 (HPLC): 94.7%

液体クロマトグラフィー (HPLC) 条件

カラム: YMC Pack A-302, 4.6mm I.D. ×150mm

溶離液: 0.1% TFA

グラディエント: CH<sub>3</sub>CN 10%-60% (25min.)

流速: 1ml/min.

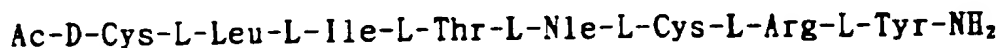
検出: 220nm

以下、実施例2乃至4の化合物は、実施例1で使用するアミノ酸の代わりに各々の化合物を構成するアミノ酸を用いて実施例1と同様に処理して得た。

実施例2

【0031】

【化7】



【0032】理化学的性状

★50★外観: 白色粉末

11

12

## アミノ酸分析値

水解条件: 6N HCl, 110℃, 22h

Thr(1)0.89 1/2Cystine(2)1.94 Ile(1)0.97

Leu(1)0.97

Nle(1)1.04 Tyr(1)0.95 NH<sub>2</sub>(1)1.29

Arg(1)1.00

純度(HPLC): 95.6%

液体カラムクロマトグラフィー(HPLC)条件

\* カラム: YMC Pack A-302, 4.6mm I.D. × 150mm

溶離液: 0.1% TFA

グラディエント: CH<sub>3</sub>CN 20%-60%(25min.)

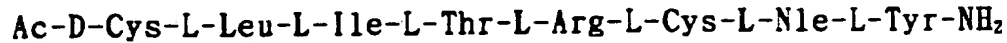
流速: 1ml/min.

検出: 220nm

実施例3

【0033】

【化8】



## 【0034】理化学的性状

外観: 白色粉末

## アミノ酸分析値

水解条件: 6N HCl, 110℃, 22h

The(1)0.89 1/2Cystine(2)1.93 Ile(1)0.96 Le

u(1)0.96

Nle(1)1.04 Tyr(1)0.96 NH<sub>2</sub>(1)1.23 Ar 20

g(1)1.00

純度(HPLC): 98.6%

※液体クロマトグラフィー(HPLC)条件

カラム: YMC Pack A-302, 4.6mm I.D. × 150mm

溶離液: 0.1% TFA

グラディエント: CH<sub>3</sub>CN 20%-60%(25min.)

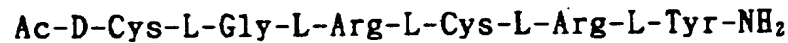
流速: 1ml/min.

検出: 220nm

実施例4

【0035】

【化9】



## 【0036】理化学的性状

外観: 白色粉末

## アミノ酸分析値

水解条件: 6N HCl, 110℃, 22h

Gly(1)0.96 1/2Cystine(2)1.91 Tyr(1)0.94 NH

s(1)1.30

Arg(2)2.00

純度(HPLC): 98.5%

液体クロマトグラフィー(HPLC)条件

カラム: YMC Pack A-302, 4.6mm I.D. × 150mm

★溶離液: 0.1% TFA

グラディエント: CH<sub>3</sub>CN 10%-60%(25min.)

30 流速: 1ml/min.

検出: 220nm

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1化合物のHPLC分析

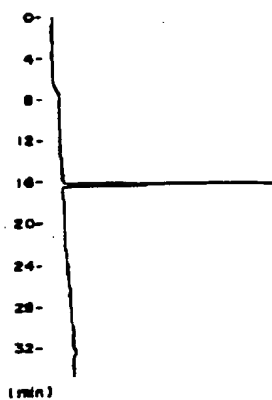
【図2】 実施例2化合物のHPLC分析

【図3】 実施例3化合物のHPLC分析

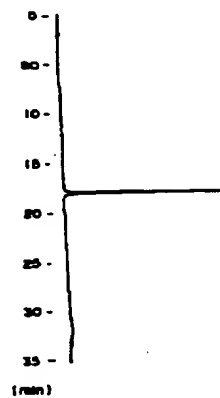
【図4】 実施例4化合物のHPLC分析

★

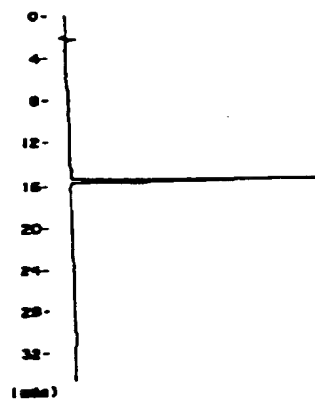
【図1】



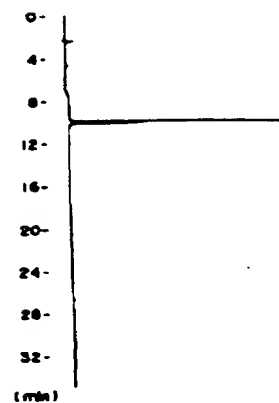
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>5</sup>

C07K 99:00

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 乾 明夫

兵庫県神戸市西区桜が丘西町4-8-2